

学校编码: 10384
学号: 21720091152093

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

链球菌双组分系统中 VICK/VICR/DNA 相互作用的研究

The interaction of VICK /VICR/DNA in *Streptococci*

吴俊

指导教师姓名: 韩爱东教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: __

评 阅 人: __

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中
以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规
范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)
的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资
助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或
课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声
明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

1 前言	1
1.1 链球菌的简介	1
1.2 致病菌的抗药性问题	1
1.3 双组分系统	2
1.3.1 双组分系统简介	2
1.3.2 组氨酸激酶 HK 的结构域以及功能	4
1.3.3 调节子 RR 的结构域以及功能	6
1.4 调节子 VICR 的磷酸化	9
1.5 本课题的研究的内容方法以及目的意义	10
1.5.1 研究内容	10
1.5.2 研究方法	10
1.5.3 研究目的及意义	11
2 材料与方法	12
2.1 材料	12
2.1.1 基因组 DNA	12
2.1.2 载体以及菌种	12
2.1.3 主要试剂及耗材	12
2.1.4 主要仪器	14
2.1.5 常用试剂配制	15
2.2 试验方法	18
2.2.1 重组质粒的构建	18
2.2.2 突变体的筛选	22
2.2.3 重组融合蛋白的试表达纯化	24
2.2.4 蛋白-蛋白相互作用以及蛋白-DNA 相互作用的研究	26
2.2.5 DNA 的合成与双链 DNA 制备	26
2.2.6 VICR 的磷酸化	27

3 结果	28
3.1 克隆的构建	28
3.1.1 重组质粒的构建	28
3.1.2 突变体的筛选	32
3.2 蛋白的表达，纯化	32
3.3 VICK-VICR 相互作用	44
3.4 VICR-DNA 相互作用	50
3.5 VICK-DNA-VICR 三者相互作用的研究	52
3.6 VICR 的磷酸化	57
4 分析和讨论	59
5 小结	62
感谢	63
参考文献	64

CONTENTS

1 Introduction.....	1
1.1 Introduction of <i>Streptococcus</i>	1
1.2 Drug-resistant problem of Pathogenic bacteria	1
1.3 Two-component system.....	2
1.3.1 An overview of Two-component system	2
1.3.2 domain architecture and function of HK.....	4
1.3.3 domain architecture and function of RR	6
1.4 the phosphorylation of VICR.....	9
1.5 Content and purpose of the research	10
1.5.1 Content of the research.....	10
1.5.2 Methods of the research	10
1.5.3 purpose of the research	11
2 Materials and methods	12
2.1 Materials	12
2.1.1 genomic DNA	12
2.1.2 Plasmid and Bacteria.....	12
2.1.3 Reagents.....	12
2.1.4 Instruments.....	14
2.1.5 Reagents Preparation	15
2.2 Methods.....	18
2.2.1 Methods of Restructuring plasmid.....	18
2.2.2 the clone of mutation.....	22
2.2.3 Protein expression and Purification	24
2.2.4 protein-protein and protein-DNA interaction.....	26
2.2.5 preparation of Double-stranded DNA.....	26
2.2.6 phosphorylation of VICR.....	27
3 Results	28

3.1 cloning work	28
3.1.1 PCR amplification and recombinant plasmid	28
3.1.2 clone of mutation	32
3.2 Expression and Purification of Recombinant Proteins	32
3.3 VICK-VICRR interaction	44
3.4 VICR-DNA interaction	50
3.5 VICK-VICR-DNA interaction	52
3.6 phosphorylation of VICR	57
4 Discussion.....	59
5 Conclusion	62
ACKNOWLEDGE.....	63
References	64

摘要

肺炎链球菌是大叶性肺炎、脑膜炎、支气管炎等疾病的主要致病菌，变异链球菌感染则会导致蛀牙，牙周炎等口腔疾病，目前几乎没有药物能有效彻底地根治由这两种链球菌引起的疾病。除了肺炎链球菌，变异链球菌外，还有大量的其它种类的致病菌，这些致病菌严重威胁了人类的健康。目前针对由细菌感染引起的疾病，临床上主要采用抗生素直接杀死致病菌。但是由于近些年抗生素的滥用，抗药性不断产生，传统的抗生素治疗法已经达不到很好的治疗效果。

双组分系统作为新型药物研究的靶点这一热门的领域已有十多年的历史。细菌的生命周期中随时可能会遭遇各生存环境的剧烈变化如环境 PH 的改变，渗透压的改变，营养物质的缺失等，细菌之所以能在在如此多变的环境下生存，主要是由于细菌内的双组分信号通路能及时感应外界信号并调节体内特异蛋白的表达。因此研究该信号通路的调节机制，能为研究阻断该信号通路转导的新型药物提供重要的理论依据。

双组分系统主要由组氨酸激酶 HK 和转录调节因子 RR 组成。位于细胞膜上组氨酸激酶起着感受器的作用，在感应外界环境信号后 HK 发生自我磷酸化反应，然后通过转磷酸化的作用，将磷酸基团转移到调节子 RR 上，RR 被磷酸化激活后能调节下游目的基因的表达，以完成对外界环境信号的反应。

本文主要是研究变异链球菌，肺炎链球菌以及枯草芽孢杆菌的 VICK/R（枯草芽孢杆菌中为 YYCG/F）双组分系统。克隆并表达了三个菌中的 VICK 胞内部分全长以及全长 VICR 蛋白。研究 VICK 和 VICR 的相互作用，VICR/YYCF 和 DNA 的相互作用，以及 VICK-VICR-DNA 三者的相互作用，实验结果发现 VICK 和 DNA 能竞争性地和 VICR 结合，这是该领域研究第一次发现 VICK-VICR-DNA 三者之间的相互作用。根据这一试验结果，本文提出假说：VICR 被磷酸化后与 VICK 的结合减弱，但是与 DNA 的结合增强以对下游的目的基因进行调节。

关键字：双组分系统；组氨酸激酶；调节子

Abstract

Streptococci are pathogens in many infectious diseases. *Streptococcus pneumoniae* is a major pathogenic bacterium in lobar pneumonia, and other infectious diseases. *Streptococcus mutans* causes tooth decay, dental arthritis and other oral diseases. Traditionally antibiotics are used to control these pathogenic bacteria. However, because of the antibiotic abuse, many bacteria have developed resistances in recent years, which has become a big threat in modern medicine,

The two-component system (TCS) has been postulated as a target for new drug for nearly ten years. The TCS can sense the changes in environments, and regulate the expression of a specific set of proteins that enable bacteria to survive. This system does not exist in animals and therefore targeting TCS may have very limited side-effects

A typical TCS system is comprised of two proteins (histidine kinase HK and response regulator RR). After sensing the stimuli, HK can go autophosphorylation, and then transfer the phosphate group to RR through its transphosphorylation activity, which in turn activates the RR to bind promoter regions and regulate target gene expression. In *Streptococci*, VICK/R is an essential TCS, also called WalR/K, is a homologous TCS of YYCG/F in *Bacilli*.

In this thesis, I cloned and expressed the intracellular domains of VICK and full-length VICR from *Streptococcus mutans* and *Streptococcus pneumoniae*. I then investigated the interactions between VICK, VICR and DNA by native PAGE and EMSA. I found that VICK binds VICR and VICR is capable to bind a DNA probe of a promoter region of glucosyltransferase gene (gtfC). More importantly, VICK directly competes with VICR to bind DNA, inhibiting VICR activity. I also repeated these experiments using YYCF and YYCG from *Bacillus subtilis*. This is the first demonstration in TCS field that HK negatively regulates RR binding to DNA *in vitro*. We hypothesize that the phosphorylation of RR may play a key role in the dissociation from HK to bind DNA for transcriptional activation. We are currently testing this hypothesis.

Key words: two component system; histidine kinase; response regulator

1 前言

1.1 链球菌的简介

肺炎链球菌是一种革兰氏阳性细菌，荚膜多糖是其致病的主要基础，肺炎链球菌主要感染抵抗力较差的儿童及老人，引起大叶性肺炎以及气管炎、中耳炎、脑膜炎、胸膜炎、心内膜炎、败血症等严重疾病^[1]。肺炎链球菌引发的疾病，具有高死亡率；高致残率等特点。

人类的口腔中存在很多不同种类的细菌。蛀牙以及牙周炎等是人类主要的由细菌感染引起的口腔疾病，其致病菌主要是变异链球菌^[2]。蛀牙是一种常见的口腔疾病，它影响着不同的人群，世界上大多数的人都深受其害，严重影响了人们的正常生活及工作。变异链球菌感染口腔后能在牙齿表面形成一层特殊的生物膜，这层生物膜能保护变异链球菌免受外界（口腔）环境变化的影响，使得变异链球菌能在口腔的不同条件下生存并大量繁殖扩增。变异链球菌在生物膜的保护下，以口腔内的糖分作为营养，产生酸性代谢物，进而改变口腔环境，破坏牙齿成分，引起蛀牙^[3]。

1.2 致病菌的抗药性问题

针对由细菌引起的疾病，传统上主要用抗生素如青霉素等进行治疗。但是大约在上个世纪八十年代，世界各地爆发了大规模的细菌传染性疾病，在这期间人们不合理地使用过量的抗生素，抗生素的滥用导致了致病菌抗药性的产生，抗性菌和普通的致病菌相比具有更大的生存优势，在有抗生素存在的条件下仍然能不断的生长繁殖，甚至扩增到世界各地^[4]。以前致病菌的抗性问题仅仅存在于一些发展中国家，但是由于微生物很容易从一个地区传播到另一地区，目前致病菌抗性问题已经成为威胁全球人类健康的重大问题，如据报道在美国、欧洲、东亚等的一些地区，临床抗药性比例达 35%甚至更高，并且这一数值呈逐年增加的趋势^[5]。其中近几年严重危害世界各地人类健康的“超级细菌”就是一种最为典型的抗药性致病菌，它是对所有抗生素都有抗药性的致病菌的统称，超级细菌的可怕之处并不是感染人体后引起的一系列病症，而是由于其能对抵普通的杀菌药物，因此对于这种致病菌人们几乎束手无策。因此在细菌性疾病治疗方面，常规的抗生素疗法已经很难达到较好的疗效。此外很多种类的抗生素除了能杀害病原菌以外，

还会对宿主产生伤害。因此为了彻底有效地治疗细菌性疾病，无毒副作用的新型的药物研发和使用迫在眉睫。

1.3 双组分系统

1.3.1 双组分系统简介

双组分系统（TCS）是一种主要存在于原核生物(在一些低等的真核生物如酵母，真菌以及一些原生动物中也存在)中的信号传导通路，该通路能感应生物体生存环境中信号的刺激，并主要通过调节原核生物体内特定蛋白表达的表达到对这些信号做出反应，使得生物体适应不同的生存环境^[6]。

双组分系统（TCS）作为一种广泛存在于细菌中的调节机制，参与细菌体内多种生理生化过程如孢子的形成，生物膜的形成，趋药性，毒力，压力反应等^[7]。如大肠杆菌基因组能编码 62 种双组分蛋白，这些蛋白调节菌体内一系列的生理活动，包括渗透压，转运，以及新陈代谢的调节等^[8]。在致病菌的感染周期以及适应宿主体内外环境的过程中会面临多种生长环境条件的改变如酸碱度，营养条件等的变化，对这些环境改变的适应主要依靠 TCS 进行调节，因此对于致病菌来说，双组分系统是其成功侵染宿主并在其内生存的先决条件^[6]。

由于双组分系统主要存在于细菌，一些古生菌以及低等的真核生物等中，但在宿主如人体等真核细胞中却不存在，因此致病菌中的双组分系统可以作为新型药物研究的靶点^[9]。目前已报道了一些双组分系统的天然抑制物，如在枯草芽孢杆菌中组氨酸激酶 KinA 主要调节孢子的形成，不饱和脂肪酸是其 ATP 依赖的自磷酸化反应的非竞争性抑制物^[10]。因此可以通过进一步研究双组分系统中，蛋白间的相互作用及调节机制等来进一步理解致病菌感染宿主的方法和途径，进而设计一种可以特异高效地抑制甚至杀死病原菌，而不影响宿主正常生理活动的新型药物。

1.3.1.1 典型的双组分系统信号通路

典型的 TCS 是由组氨酸激酶(HK)和调节子(RR)两种蛋白组成。其中位于细菌细胞膜上的组氨酸激酶 HK 作为一种感受器，主要感应外界环境中的信号。在外界环境的刺激下，HK 发生 ATP 依赖性的自磷酸化反应（其磷酸化位点是位于 HK 二聚化区域的特定组氨酸残基），这种自磷酸化反应发生在同源二聚体的 HK 的两个单分子间，其中一个单体作为激酶催化另一单体在保守的组氨酸残基

上发生磷酸化反应^[11, 12]。磷酸化的组氨酸再通过转磷酸化形式，把磷酸基团转移到调节子 RR 上，作为转录调节因子的 RR 被磷酸化后能促进或抑制下游特定基因的表达，实现对外界环境变化作出相应的反应^[13]。总之一一个典型双组分系统的信号传导途径为 His-Asp 如图 1^[8]。

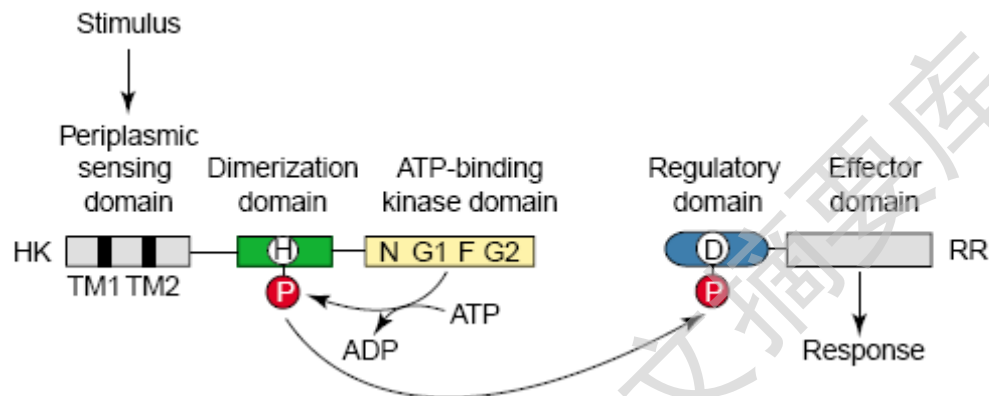


图 1 典型的 TCS 信号通路^[8]

Fig1 Typical TCS singal pathway^[8]

1.3.1.2 非典型的双组分系统信号通路

除了典型的双组分系统外，还有一种较为复杂的双组分系统。该系统包括三个部分：混合组氨酸蛋白激酶（同时含有能被磷酸化的组氨酸和天冬氨酸残基）、应答调节蛋白（RR）、含有组氨酸的磷酸转移蛋白（Hpt），Hpt 对于信号的传递是必须的，它主要是把磷酸基团从磷酸化的混合组氨酸激酶上传递到细胞质内的 RR 上，该系统磷酸基团的传递途径是 His-Asp-His-Asp 如图 2^[8]。在复杂的双组分系统中主要进行多步磷酸基团的传递，而且多个蛋白参与反应，为信号调节提供了多个调控位点，同时增加了对信号反应的精确性^[14]。此类系统多见于真核生物，如酿酒酵母、裂变酵母、拟南芥等^[15]。据统计约有 20% 的组氨酸激酶属于混合组氨酸激酶^[16]。近年，在原核生物，如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等中也相继发现了此类系统^[17]。但是目前对于复杂的双组分系统中具体的调节机制的研究尚未清楚。

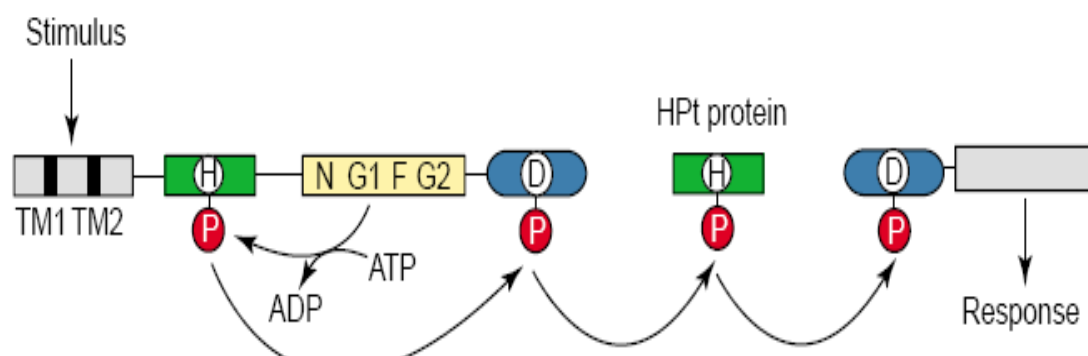

 图 2 复杂的 TCS 信号传导通路^[8]

 Fig2 Atypical TCS signal pathway^[8]

1.3.2 组氨酸激酶 HK 的结构域以及功能

曾有一项研究分析基因组序列数据库结果发现 HK 家族约有 350 个成员^[16]。这些 HK 大多数是细胞膜结合蛋白，其中膜结合部分的感应区的序列在不同的 HK 中差异较大，由此可以说明 HK 感应外界信号的多样性，但是 HK 的激酶区域（催化活性区域）趋势高度保守的，并可以根据主要的保守序列分为 H, N, G1, F 以及 G2 boxes^[18]。

组氨酸激酶作为一种能感应外界环境信号的膜蛋白，主要由跨膜的感应部分（TM），HAMP 区域，PAS 区域，DHP 区域以及催化活性区域组成^[19]，如图 3。



图 3 组氨酸激酶 VICK 区域结构

Fig3 The domain architecture of the histidine kinase VICK

组氨酸激酶的跨膜的感应部分能感应外界环境中的信号。双组分系统感应信号的过程中，除了组氨酸激酶外，还会有多种辅助性的蛋白参与，这些蛋白可能位于膜外侧也可能位于膜内侧^[20]，例如在肠道细菌中 Rcs 磷酸化反应能够调节一系列的生理活动包括毒力，膜形成，流动性以及分泌胞外多糖等^[21]。膜外侧的脂蛋白 RcsF 能接受一个信号（可能由是环境中的抗菌多肽引起的失调），并激活组氨酸激酶 RcsC，导致 Rcs 磷酸化反应的激活，进而调节胞内下游目的基因的表达^[22]。

但是目前对于这种调节是否由于RcsF和RcsC的直接结合或者是否由于膜蛋白IgaA (IgaA 能抑制HK RcsC的激酶活性) 的相互作用引起的, 尚未研究清楚^[23, 24]。

HAMP最初是在一系列信号蛋白的保守序列的比对中发现的, 并推测它的功能是参与信号转导途径而并非是感受外界刺激^[25]。然而后来的研究发现某些信号转导蛋白并不具备N端的感受器元件, 而只具备HAMP, 比如链球菌中的VICK, 由此推测HAMP能通过与其它含感受器元件的蛋白相互作用从而在刺激感知中发挥作用^[26]。人们研究发现在HK的同源二聚体中HAMP区域主要形成一个平行的四螺旋束如图4^[27], 并假设信号的传递方式主要是HK接受信号后跨膜区域的螺旋触发HAMP中相邻螺旋间的旋转方式发生改变进而改变这一螺旋束的折叠, 引起构象的变化, 因此感受到的信号能通过螺旋旋转和倾斜的形式传递到HK的催化活性区域^[27-29]。

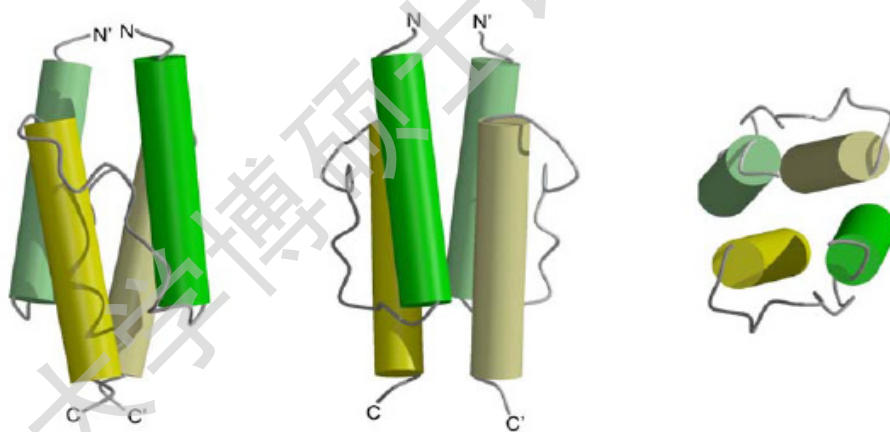


图 4 典型的HAMP区域的模式图^[27]

Fig4 the Model of typical HAMP domain^[27]

组氨酸激酶的DHP区域又被称为二聚化组氨酸磷酸转移区域, 主要由两个螺旋发卡单体形成一个二聚化的四螺旋束, DHP N端的 $\alpha 1$ 主要形成能接受磷酸基团的H-Box, 其中含有能被磷酸化的组氨酸残基^[30]。DHP区域与HAMP区域间通过一段连续的 α 螺旋连接, 这一 α 螺旋是HAMP最后一个螺旋以及DHP第一个螺旋的组成部分^[31]。人们把这一四螺旋束中靠近HAMP的上半部分称为膜邻近区, 而把底部那部分成为基部^[31]。研究发现DHP的膜邻近区具有结构上的可塑性, 而DHP的基部区

却相对的静止，符合“DHP基部对于维持HK的二聚化以及编码的特异性很重要”这一假说^[32]。在不同的HK中DHP区域的结构稍有不同，如HK EnvZ中DHP区域的NMR结构，和海栖热袍菌中HK TM0853的DHP晶体结构比较，大体上的四螺旋束架构相同，但是两者螺旋的排列顺序不同^[30, 33]。

组氨酸激酶的CA区域又称为催化活性区域，是组氨酸激酶的特征性区域，具有ATP酶活性，能结合ATP磷酸化组氨酸残基，是一个相对保守区域，由350个以上氨基酸组成，主要负责ATP结合和激酶的磷酸化反应，具有ATP结合位点能结合ATP并把HK二聚体中另外一个单体上的特定的组氨酸残基磷酸化^[34]。CA区域主要由5个 β -折叠和三个 α 螺旋形成三明治状结构，这一折叠与任何已知的Ser/Thr/Tyr 激酶活性区域不同，由此说明组氨酸激酶在进化上与其他的激酶不同^[33, 35]。HK的CA区域结构上与Hsp90以及DNA促旋酶等激酶中的ATPase 区域结构具有同源性^[11]。ATP结合位点主要是由N,G1,F,G2盒子中保守性的氨基酸残基组成，同时也是HK蛋白中高度灵活的区域^[36]。

1.3.3 调节子 RR 的结构域以及功能

调节子蛋白（RR）主要有N端的接受区和C端的DNA结合区两个功能区组成，在两个功能区之间有一段灵活的链接区如图5，其中RR的N端接受区是一段高度保守的区域，主要具有接受磷酸基团的功能，D52为其磷酸化位点，C端DNA结合区也称为效应区或者信号输出区是与DNA结合的区域，RR作为转录因子，在接受磷酸基团被磷酸化后能调节下游目的基因的表达^[37]。人们使用微阵列芯片分析技术发现无论是磷酸化形式还是非磷酸化形式的RR都能与下游的目的基因相结合，但是磷酸化后RR与DNA的结合能力明显增强，但是具体机制目前尚不清楚^[38]。

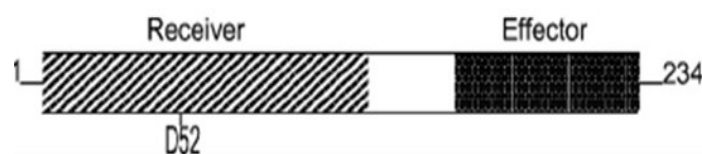


图 5 RR 的功能区域^[37]

Fig5 The domain architecture of the response regulator RR^[37]

调节子 RR N 端的接受区通常是形成 $(\beta\alpha)_5$ 拓扑结构， β 折叠和 α 螺旋交替

排列，进一步折叠成中心 5 个平行的 β 折叠被三个 α 螺旋在一侧，两个在另一侧包围的结构^[39]。接受区域显著的特征就是同样的基本结构却能 60 多种不同的 DNA 结合区域配对并对它们进行调节，产生不同的信号输出^[40]。一些调节子的接受区域并不和 DNA 结合区域连接，例如在细菌中约有 15% 的 RR，在古生菌中约有 50% 的 RR 含有独立的接受区域，这些独立的接受区域可能通过与胞内其他的蛋白相结合来行使功能，而不是与 DNA 结合区域相互作用^[41]。调节子的接受区域具有自我磷酸化的功能，虽然 RR 能接受来自 HK 的磷酸基团，但是在体外环境下利用合适的小分子磷酸基团供体，接受区域能催化自身的磷酸化反应^[42]。这些小分子的磷酸基团供体主要分为两大类：酰基磷酸盐类如乙酰磷酸、氨甲酰磷酸（该类小分子参与的磷酸化反应主要是 PH 依赖性的）以及氨基磷酸酯类（非 PH 依赖性），因为 HK 组氨酸残基上的磷酸基团属于氨基磷酸酯类，因此氨基磷酸酯类化学小分子可以作为研究 RR 自我磷酸化的有利工具，但是它们生理上的关联性却不清楚^[39]。然而用酰基磷酸盐类研究 RR 的自我磷酸化具有生理上的关联性，能用来研究代谢状态和双组分系统之间的关系^[43]。

调节子 RR 被磷酸化后会发生构象上的变化。人们研究磷酸化形式的 RR 的接受区域以及接受区和 BeF_3^- （一种磷酸基团类似物）的晶体结构发现接受区域激活状态（磷酸化形式）和非激活状态（非磷酸化形式）构象存在很大的不同^[44]。磷酸基的三个氧原子能分别特异性地和接受区域的活性部位的保守性的残基相互作用，能和 Thr/Ser 间形成氢键，和 Lys 间形成盐键来协调金属离子，其中接受区域磷酸化形式和非磷酸化形式构象上主要区别 $\alpha 4\beta 5\alpha 5$ 面，该部分主要功能是通过和 RR 的其他区域或其他蛋白相互作用来控制信号的输出^[45]。

RR 的接受区域还能催化自我去磷酸化反应。在双组分系统中 RR 主要的去磷酸化反应是通过其他蛋白的磷酸酶活性催化的，但是有实验表明其他具有磷酸酶活性的蛋白催化 RR 去磷酸化时主要是促进 RR 本身的自我磷酸化反应而不是利用其他的机制^[46-48]。接受区域的自我去磷酸化反应和自我磷酸化反应途径很相似，但是是相反的过程，在自我去磷酸化过程中，一个水分子对磷原子进行亲质子撞击，再次产生一个由保守性的 Thr/Ser，保守性的 Lys 以及金属离子协调的 PO_3 过渡状态^[39]。

RR 的 DNA 结合区域也被称为信号输出区域，只要是和下游的 DNA 结合，行使

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库